

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09617

研究課題名(和文) SARS-CoV2偽型レンチウイルスによる鼻腔感染阻害薬のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening for inhibitors of nasal infection by SARS-CoV2 pseudotyped lentivirus

研究代表者

大江 洋子 (Oe, Yoko)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：90803180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではギャップ結合を指標として当グループが開発した薬剤スクリーニング技術「GJscreen」(特許取得済)によりSARS-CoV2感染の鼻腔上皮細胞への阻害効果を持つ候補物質を見出す新規創薬技術を確立することを目的とした。BSL2の範囲内で治療薬開発ができるレンチウイルスにSARS-Cov2等のウイルスの単一スパイクタンパク質(S-protein等)のみをエンベロープに置換することにより、BSL2レベルのin vitro感染実験で上記感染阻害効果を示すペプチド分子種を同定することに成功し、そのメカニズムの解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンドサイトーシス等による細胞膜タンパク質(ギャップ結合等)の細胞内取り込みに着目した薬剤スクリーニングはこれまで行われておらず、鼻腔上皮細胞と臨床検体の鼻粘膜組織片を用いて行う新たな切り口からのCOVID19の薬剤スクリーニング系である。既存薬だけでなく新規の中分子医薬品等同時にスクリーニングすることにより、SARS-CoV2の初期感染経路に最も適した阻害物質を選抜することが可能となる。本研究で効果を同定したペプチド分子種はその選抜の結果であり、学術的および社会的意義が非常に高いといえる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to establish a new drug discovery technology to find candidate substances with inhibitory effects on nasal epithelial cells infected with SARS-Cov2 by using the drug screening technology "GJscreen" (patented) developed by our group using gap binding as an indicator. By replacing only a single spike protein (S-protein, etc.) of SARS-Cov2 and other viruses in the lentivirus envelope, It was succeeded that identify peptide molecular species that exhibit the above inhibitory effect on infection in vitro at the BSL2 level and elucidated the mechanism of this effect.

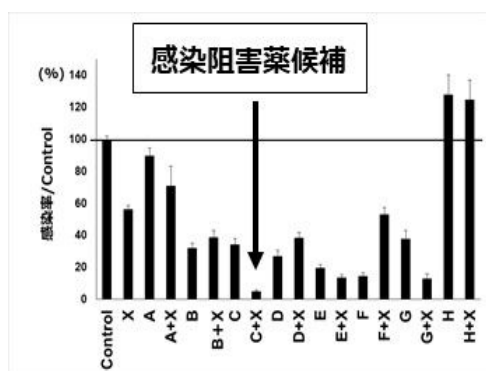
研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：SARS-Cov2 レンチウイルス ギャップ結合複合体 薬剤選抜法 新型コロナウイルスSARS-Cov2 鼻腔感染阻害薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

パンデミックにより世界中で COVID19 に対する薬剤開発が進められているが、ウイルス変異株や新たな振興再興感染症への対策のために多様な薬剤スクリーニング戦略が必須と考えられている。多くの病原体は宿主細胞細胞膜のトラフィッキング経路を利用して細胞内に侵入する。細胞膜の取り込みを行うエンドサイトーシスもウイルス侵入の経路である。ギャップ結合は短期間でのターンオーバー(合成と分解)を繰り返し、細胞膜からのタンパク質の細胞内取り込み(internalization)にエンドサイトーシス経路を用いることが知られている。当グループではギャップ結合をコードする Connexin26 遺伝子(GJB2)の変異による遺伝性難聴の研究においてギャップ結合の過剰なエンドサイトーシスが病態に関与することを発見した。さらにこのエンドサイトーシスによる細胞内取り込みを阻害し、崩壊したギャップ結合複合体を安定化する薬剤を選抜する新規スクリーニング技術「GJscreen」(特許出願済)をこれまでに開発している。同方法により既に複数の薬剤が選抜されているが、これらの中には過剰なエンドサイトーシスを抑制する薬剤が存在すると考えられる。コロナウイルスの一種マウス肝炎ウイルス(MHV)の感染にギャップ結合形成が関与するとの報告があることから、選抜された薬剤の中にエンドサイトーシス阻害などによる SARS-CoV2 感染を阻害する薬剤が含まれるとの仮説を立てた。この仮説を元に SARS-CoV2 のスパイクタンパク質(Sタンパク質)を持つ SARS-CoV2 偽型レンチウイルスを作成し、選抜した薬剤による鼻腔上皮細胞への感染阻害実験を行ったところ、有意な感染阻止能を持つ薬剤が存在することをこれまでに明らかにしている。

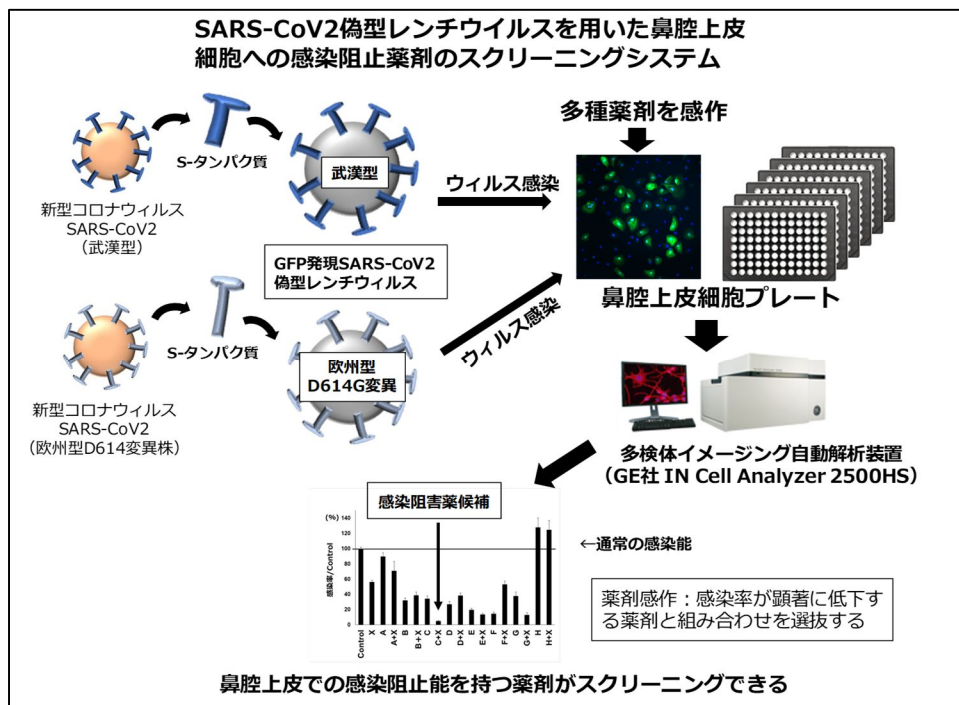


申請者らの予備実験ではある阻害薬と細胞増殖制御薬との組み合わせにより偽型 SARS-CoV2 ウイルスの鼻腔上皮細胞への有意な感染阻止能が確認された。

2. 研究の目的

本課題ではギャップ結合を指標として当グループが開発した薬剤スクリーニング技術「GJscreen」(特許取得済)により SARS-CoV2 感染の鼻腔上皮細胞への阻害効果を持つ候補物質を見出す新規創薬技術を確立する。BSL2 の範囲内で治療薬開発ができるレンチウイルスに SARS-Cov2 等のウイルスの単一スパイクタンパク質(S-protein 等)のみをエンベロープに置換することにより、BSL2 レベルの in vitro 感染実験で上記感染阻害効果を示す化合物を開発することを目的とした。

コロナウイルスの細胞侵入および宿主生物種を限定する指向性の進化メカニズムを理解するためには、ウイルスエンベロープの S タンパク質と宿主受容体との相互作用を理解することが必須である。通常のコロナウイルスを扱える実験室に限られるため、代替方法としてコロナウイルスの S タンパク質を外殻させたシュードタイプ(偽型)レンチウイルスを利用することとする。コロナウイルスとレンチウイルスは、ともに外層が脂質二重膜からなるエンベロープウイルスで、吸着する宿主・組織特異性を決める受容体タンパク質が外界に向かって突出した形状を取っている。偽型レンチウイルスのパッケージングの際、通常の水疱性口炎ウイルスの G タンパク質(VSV-G)エンベロープの代わりに、コロナウイルスの S タンパク質をウイルス産生細胞の細胞表面に高発現させ、ウイルス粒子を産生させる。この偽型レンチウイルスは、S タンパク質と宿主細胞の受容体との結合を介して宿主細胞に侵入するメカニズムを模倣することが可能である。



3. 研究の方法

武漢型 (Lenti-Cov2-S-GFP) とベンベロップ S タンパク質に D614G 変異を持つ欧州型 (Lenti-Cov2-S-D614G-GFP) を作成した。同レンチウイルスは緑色蛍光タンパク質を発現し、SARS-Cov2 の疑似エンベロップとして SARS-Cov2 S-Protein (武漢型と D614G 変異を持つ欧州型) を有する、対象群として通常用いられる VSVG をエンベロップに持つレンチウイルス (Lenti-VSVG) を用い一般的なレンチウイルスへの感染との相違を求め、COVID19 特有の感染阻害物質を選抜した。これまでの研究では、あるペプチド分子の存在の有無下でのヒト上皮細胞における Lenti-CoV2-S-GFP の感染についての評価を行った。

また Toll like receptor (TLR)シグナルのような自然免疫系シグナルの活性化による ACE2、TMPRSS2 等のリガンド発現の影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Poly(I:C)による ACE2 と TMPRSS2 の mRNA 発現量増加

TLR刺激がACE2およびTMPRSS2の発現に影響を及ぼすかどうかを調べるため、いくつかのTLRアゴニストで24時間刺激した後のNHBE細胞におけるmRNA発現を調べた。ACE2のmRNA発現は、Poly(I:C)によるTLR3刺激で有意に増加した (22.47±0.1, p<0.0001, 図1A)。TMPRSS2 mRNA発現もまた、Poly(I:C)によるTLR3刺激により有意に増加した (7.697±0.26, p<0.0001, 図1B)。これらの知見は、Poly(I:C)によるTLR3刺激がNHBEにおけるACE2およびTMPRSS2の発現レベルを増加させることを示している。

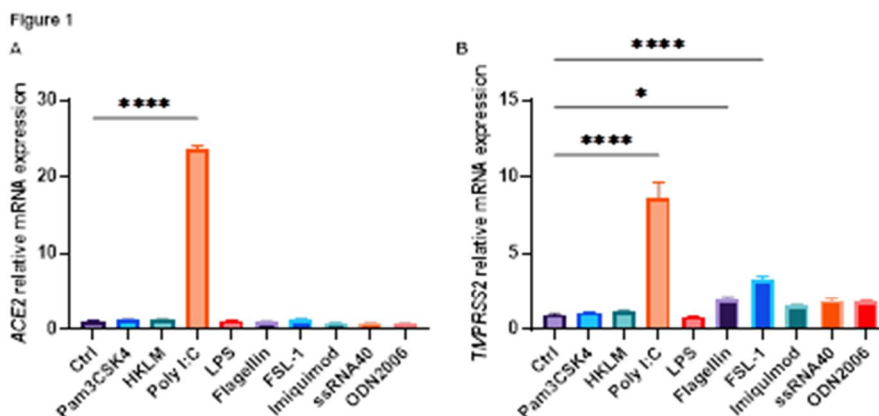


Figure 1 Poly I:C increases ACE2 mRNA as well as TMPRSS2 expression in human bronchial epithelial cells. Relative mRNA expression of ACE2 (A) and TMPRSS2 (B) after stimulation with TLR agonists for 24 hours in NHBEs. The following TLR agonists were used: Pam3CSK4 for TLR1/2, HKLM for TLR2, Poly I:C for TLR3, LPs for TLR4, Flagellin for TLR5, FSL-1 for TLR6/2, Imiquimod for TLR7, ssRNA40 for TLR8, and ODN2006 for TLR9. Relative mRNA expression was determined by normalization against untreated control cells and GAPDH. Data are means ± standard deviation (s.d.) of values from three independent experiments. *p < 0.05, ****p < 0.0001.

(2) hBD-2 による Ploy(I:C)誘導性 ACE2 mRNA の発現増加の抑制

異なる濃度の FP の Ploy(I:C)誘導性 ACE2 および TMPRSS2 mRNA 発現増加に対する阻害効果を調べたところ、Poly(I:C)による ACE2 発現上昇の有意な抑制は hBD-2 で観察されたが、hBD1、hBD-3、hBD4 では観察されなかった(図 2A)。一方、hBD-2 は、他の hBD ではなく、NHBE における TMPRSS2 の mRNA 発現を抑制する傾向があった(図 2B)。

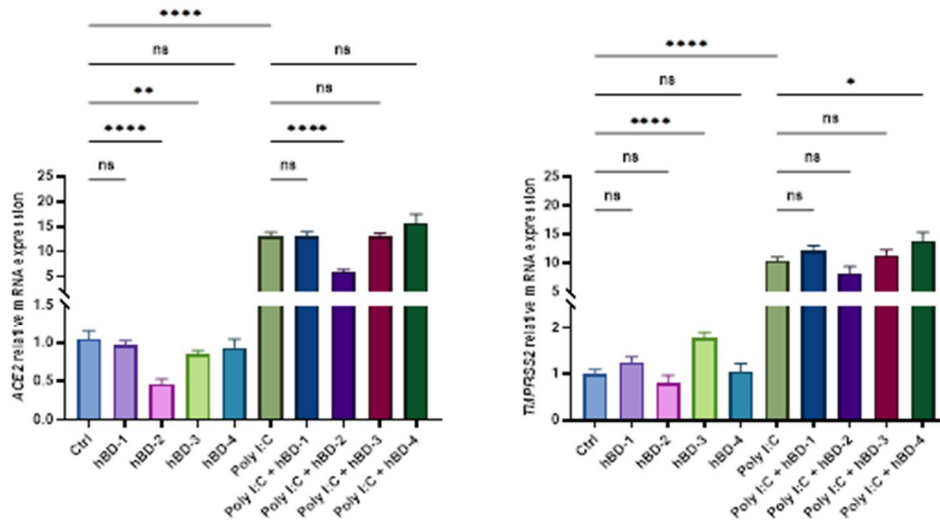


Figure 2 The poly(I:C)-induced increase in ACE2 mRNA expression is significantly suppressed by hBD-2. Relative mRNA expression of ACE2 (A) and TMPRSS2 (B) after stimulation with poly(I:C) in the presence or absence of hBDs for 24 hours in NHBEs. Relative mRNA expression was determined by normalization against untreated control cells and GAPDH. Data are means \pm standard deviation (s.d.) of values from three independent experiments. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

(3) hBD-2 による NHBE における Lenti-CoV2-S-GFP の感染の抑制

NHBE における SARS-CoV-2-S 偽型 GFP レンチウイルス(Lenti-CoV2-S-GFP)による感染抑制効果を調べた。Lenti-CoV2-S-GFP の有意な感染抑制は hBD-2 で観察されたが、hBD1、hBD-3、hBD4 では観察されなかった (図 3)。

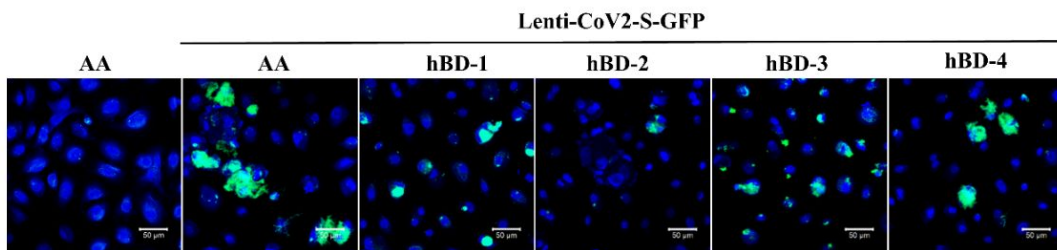


Figure 3 Infection of Lenti-CoV2-S-GFP in human primary bronchial epithelial cells in the presence or not of human β -defensins (hBDs)

Human primary bronchial epithelial cells were infected by SARS-CoV-2-S pseudotyped GFP lentivirus (Lenti-CoV2-S-GFP) at a MOI of 100 and stimulated with the vehicle acetic acid (AA), 10 μ g/mL of hBD-1, hBD-2, hBD-3 or hBD-4 for 24h. Cells were clearly infected by lentivirus. Interestingly, The infection effect was dramatically decreased by the treatment of hBD-2 but not hBD-1, hBD-2 nor hBD4.

以上より、抗菌ペプチド hBD-2 は、ヒト気管支上皮細胞における ACE2 と TMPRSS2 の抑制を介して、SARS-CoV-2 の感染を抑制する可能性があり、現在、このメカニズムについて解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Cheng Chen, Kyoko Shirai, Atsushi Kawano, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling Gap junction beta 2 gene-related deafness with human iPSC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1492-1442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Cheng Chen, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Akito Koike, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya	4. 巻 21
2. 論文標題 Activin/Nodal/TGF- Pathway Inhibitor Accelerates BMP4-Induced Cochlear Gap Junction Formation During in vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.602197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiga, Rina Matsuoka, Takashi Anzai, Remi Hibiya-Motegi, Shori Tajima, Katsuhisa Ikeda, Wado Akamatsu, Kazusaku Kamiya	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p. G45E/Y136X mutation in GJB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	神谷 和作 (Kamiya Kazusaku) (10374159)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松本 文彦 (Matsumoto Fumihiko) (70445584)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関